

PCT/JP99/05216

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

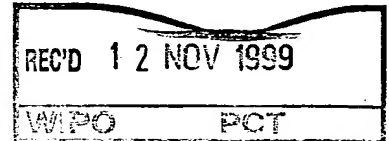
24.09.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年 9月25日



出願番号
Application Number:

平成10年特許願第271626号

出願人
Applicant (s):

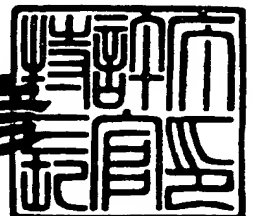
武田薬品工業株式会社

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年10月29日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3073463

【書類名】 特許願

【整理番号】 A98176

【提出日】 平成10年 9月25日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明の名称】 ペプチド誘導体

【請求項の数】 27

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府堺市南向陽町1丁2番8号

 【氏名】 北田 千恵子

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ1
402号

 【氏名】 日沼 州司

【特許出願人】

 【識別番号】 000002934

 【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

 【代表者】 武田 國男

【代理人】

 【識別番号】 100073955

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

 【識別番号】 100077012

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 岩谷 龍

【選任した代理人】

 【識別番号】 100110456

 【弁理士】

【氏名又は名称】 内山 務

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9000052

【包括委任状番号】 9000053

【包括委任状番号】 9721047

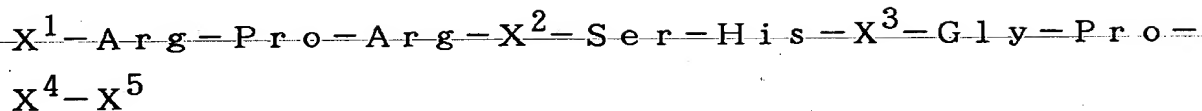
【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】ペプチド誘導体

【特許請求の範囲】

【請求項1】式



〔式中、 X^1 は水素原子またはそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし25個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖を示し、 X^2 は側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基を示し、 X^3 は側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基または側鎖が C_{1-4} アシル基または C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基を示し、 X^4 は側鎖が置換されていてもよい中性または芳香性アミノ酸残基を示し、 X^5 は①側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基、または②側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基と側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基が結合してなるジペプチド鎖またはそのC末端カルボン酸がアルコールあるいはアルデヒドに還元されたペプチド誘導体を示し、式中の $-\text{Arg}-\text{Pro}-\text{Arg}-$ 、 $-\text{Ser}-\text{His}-$ または $-\text{Gly}-\text{Pro}-$ 中の各アミノ酸残基の側鎖は置換されていてもよい。但し、 X^2 がLeuを、 X^3 がLysを、 X^4 がMetを示し、かつ X^5 が①Proまたは②Pro-Pheを示し、式中の $-\text{Arg}-\text{Pro}-\text{Arg}-$ が無置換の $-\text{Arg}-\text{Pro}-\text{Arg}-$ を、 $-\text{Ser}-\text{His}-$ が無置換の $-\text{Ser}-\text{His}-$ を、かつ $-\text{Gly}-\text{Pro}-$ が無置換の $-\text{Gly}-\text{Pro}-$ を示す場合を除く。〕で表されるペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項2】 X^1 が側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基である請求項1記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項3】 X^1 が側鎖が置換されていてもよいpGluまたは側鎖が置換されていてもよいGlnである請求項1記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項4】 X^1 が式 Y^1-Y^2 （式中、 Y^1 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし17個のアミノ酸からなるアミノ酸残基または

ペプチド鎖を示し、 Y^2 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし8個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖を示す)で表される請求項1記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項5】 Y^2 が①式 $B^1-B^2-B^3-B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、 B^1 ないし B^8 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示す)、②式 $B^2-B^3-B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、③式 $B^3-B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、④式 $B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、⑤式 $B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、⑥式 $B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す) または⑦式 B^7-B^8 (式中、各記号は上記と同意義を示す) で表されるペプチド鎖である請求項4記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項6】 B^1 が側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基である請求項5記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項7】 B^1 が側鎖が置換されていてもよいGlyである請求項6記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項8】 B^2 、 B^3 および B^4 がそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基である請求項5記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項9】 B^5 が芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基である請求項5記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項10】 B^6 および B^7 がそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基である請求項5記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項11】 B^8 が側鎖が置換されていてもよいGlnである請求項5記載のペプチド。

【請求項12】 Y^1 が(a)式 $A^1-A^2-A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、 A^1 ないし A^{17} はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示す)、

(b) 式 $A^2-A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(c) 式 $A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(d) 式 $A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(e) 式 $A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(f) 式 $A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(g) 式 $A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(h) 式 $A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(i) 式 $A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(j) 式 $A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(k) 式 $A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(l) 式 $A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(m) 式 $A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(n) 式 $A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(o) 式 $A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(p) 式 $A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す) または (q) A^{17} (A^{17} は前記と同意義を示す) で表されるアミノ酸残基またはペプチド鎖である請求項4記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項13】 A^1 が芳香性の側鎖を有するアミノ酸残基である請求項12記載のアミノ酸残基またはペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項14】 A^2 および A^3 が側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基である請求項12記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項15】 A^4 が側鎖が置換されていてもよい中性または塩基性-L-アミノ酸残基である請求項12記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項 16】 A^5 が側鎖が置換されていてもよい P r o である請求項 12 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項 17】 A^6 および A^9 がそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基である請求項 12 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項 18】 A^7 および A^{10} がそれぞれ同一または異なって、ヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基または置換されていてもよい中性- アミノ酸残基である請求項 12 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項 19】 A^8 がヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基である請求項 12 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項 20】 A^8 が P r o または H y p である請求項 19 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項 21】 A^{10} がヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基である請求項 12 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項 22】 A^{11} ないし A^{14} がそれぞれ同一または異なって置換されていてもよい中性アミノ酸残基である請求項 12 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項 23】 A^{15} が芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基である請求項 12 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項 24】 A^{15} が T r p である請求項 23 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項 25】 A^{16} および A^{17} がそれぞれ同一または異なって中性アミノ酸残基である請求項 12 記載のアミノ酸残基またはペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩。

【請求項 26】 請求項 1 記載のペプチドまたはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬。

【請求項 27】 中枢神経機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、免疫機能調節剤、消化器機能調節剤、代謝機能調節剤または生殖器機能調節剤である請求項 26 記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、オーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるAPJに対するリガンド活性を有する新規ペプチドおよびその用途などに関する。

【0002】

【従来の技術】

多くのホルモンや神経伝達物質は細胞膜に存在する特異的なレセプターを通じて生体の機能を調節している。これらのレセプターの多くは共役している guanine nucleotide-binding protein (以下、G蛋白質と略称する場合がある) の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行い、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプターあるいは7回膜貫通型レセプターと総称される。

このようなホルモンや神経伝達物質とG蛋白質共役型レセプターとの相互作用を通じて生体のホメオスタシスの維持、生殖、個体の発達、代謝、成長、神経系、循環器系、免疫系、消化器系、代謝系の調節などの生体にとって重要な機能調節が行われている。このように生体機能の調節には様々なホルモンや神経伝達物質に対するレセプター蛋白質が存在し、その機能調節に重要な役割を果たしていることがわかっているが、未知の作用物質(ホルモンや神経伝達物質など)およびそれに対するレセプターが存在するかどうかについては未だ不明なことが多い。

近年、G蛋白質共役型レセプター蛋白質がその構造の一部にアミノ酸配列の類似性を示すことを利用して、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション(Polymerase Chain Reaction: 以下、PCRと略称する)法によって新規レセプター蛋白質をコードするDNAを探索する方法が行われるようになり、数多くの、リガンドが不明ないわゆるオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質がクローニングされている(Libert, F., et al. Science, 244, 569-572, 1989, Welch, S.K., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 209, 606-613, 1995, Marchese, A., et al., Genomics, 23, 609-618, 1994, Marchese, A., Genomics, 29, 335-344

、1995)。また、ゲノムDNAあるいはcDNAのランダムな配列決定によっても、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質が次々と見出されている(Nomura, N., et al., DNA Research 1巻、27-35頁、1994年)。これらのオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質のリガンドを決定する一般的な手段としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の一次構造上の類似性から推定するしかなかった。しかし、多くのオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質は既知のレセプターとのホモロジーが低いものが多く、実際は既知リガンドのレセプターサブタイプである場合を除いては一次構造上の類似性だけでそのリガンドを推定することは困難であった。一方、遺伝子解析から多くのオーファンG蛋白質共役型レセプターがみつまっていることから対応する未知のリガンドがまだ数多く存在していることが推定されているが、これまで実際にオーファンG蛋白質共役型レセプターのリガンドを同定した例は数少ない。

【0003】

最近、動物細胞にオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを導入し、新規オピオイドペプチドを探索した例が報告されている(Reinsheld, R. K. et al., Science, 270巻、792-794頁、1995年、Menular, J.-C., et al., Nature 377巻、532-535頁、1995年)。しかしこの場合は既知G蛋白質共役型レセプター蛋白質との類似性や組織分布から、容易にリガンドはオピオイドペプチドのファミリーに属することが予想されていた。オピオイドレセプターを介して生体に作用する物質の研究・開発の歴史は長く、種々のアンタゴニスト・アゴニストが開発されていた。そこで人為的に合成した化合物群の中からこの受容体に対するアゴニストを見出し、それをプローブとして受容体cDNA導入細胞における受容体の発現を検証した後に、アゴニストと同じ様な細胞内情報伝達系の活性化物質を探索し、これを精製し、リガンドの構造を決定している。

またカタツムリのオーファンG蛋白質共役型レセプター(GRL104)をコードするcDNAをCHO細胞に導入してレセプター発現細胞での特異的な細胞内遊離カルシウム濃度の上昇を指標として新規生理活性ペプチドを同定した例が報告されているが(Cox, K. J. A., et al., J. Neurosci., 17(4), 1197-1205, 1997)、この新規生理活性ペプチドは既知のleucokininと高い相同性を有し、GR

L104は既知のleucokininとの反応性もあった。このようにオーファンG蛋白質共役型レセプター蛋白質の中でリガンドがおおよそ推定されうるものはほとんどなく、特に、既知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質ファミリーと類似性が低い場合、リガンドに関する情報はほとんどなく、リガンドを推定することは困難であった。

オーファンG蛋白質共役型レセプターとして報告されているものの一つにAPJがある(O'Dowd, B.F., et al., Gene, 436, 355-359, 1993)。APJはアンギオテンシンレセプター(AT1)と低いホモロジーがある。APJに対する天然のリガンドおよびその部分ペプチドは、特願平10-220853号に記載されているが、天然型のリガンドに人工的に修飾を加えた修飾体(例えば天然型のリガンドの1個ないし数個の構成アミノ酸を他のアミノ酸で置換したもの、天然型のリガンドの1個ないし数個の構成アミノ酸の側鎖を適当な置換基で置換したものなど)については、全く知られていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

中枢神経系、循環器系、生殖器系、免疫系、消化器等で発現しているオーファンG蛋白質共役型レセプターであるAPJに対する天然型のリガンドに人工的に修飾を加えたペプチドは、天然型のリガントに比べ、医薬などとしてより有用であると考えられるが、これまでに天然型のリガンドに比べ、医薬などとしてより有用なペプチドの構造および機能については明らかにされていない。

【0005】

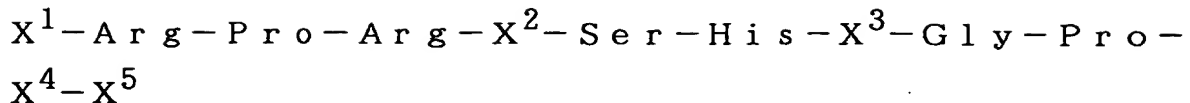
【課題を解決するための手段】

本発明者らは、かかる課題に基づいて、該天然型リガンドの修飾体であるペプチドと上記レセプター蛋白質との結合性の変化を指標とし、種々の新規ペプチドを合成し、天然型リガンドの活性部位を予想・特定することにより、医薬としてより有用な天然型リガンドの修飾体を見いだした。

【0006】

すなわち、本発明は、

(1) 式



[式中、 X^1 は水素原子またはそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし25個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖を示し、 X^2 は側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基を示し、 X^3 は側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基または側鎖が C_{1-4} アシル基または C_{1-6} アルキル基で置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基を示し、 X^4 は側鎖が置換されていてもよい中性または芳香性アミノ酸残基を示し、 X^5 は①側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基、または②側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基と側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基が結合してなるジペプチド鎖またはそのC末端カルボン酸がアルコールあるいはアルデヒドに還元されたペプチド誘導体を示し、式中の $-\text{Arg} - \text{Pro} - \text{Arg}-$ 、 $-\text{Ser} - \text{His}-$ または $-\text{Gly} - \text{Pro}-$ 中の各アミノ酸残基の側鎖は置換されていてもよい。但し、 X^2 がLeuを、 X^3 がLysを、 X^4 がMetを示し、かつ X^5 が①Proまたは②Pro-Pheを示し、式中の $-\text{Arg} - \text{Pro} - \text{Arg}-$ が無置換の $-\text{Arg} - \text{Pro} - \text{Arg}-$ を、 $-\text{Ser} - \text{His}-$ が無置換の $-\text{Ser} - \text{His}-$ を、かつ $-\text{Gly} - \text{Pro}-$ が無置換の $-\text{Gly} - \text{Pro}-$ を示す場合を除く。]で表されるペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(2) X^1 が側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基である上記(1)記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(3) X^1 が側鎖が置換されていてもよいpGluまたは側鎖が置換されていてもよいGlnである上記(1)記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(4) X^1 が式 $Y^1 - Y^2$ (式中、 Y^1 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし17個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖を示し、 Y^2 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし8個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖を示す)で表される上記(1)記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(5) Y^2 が①式 $B^1 - B^2 - B^3 - B^4 - B^5 - B^6 - B^7 - B^8$ (式中、 B^1 ない

し B^8 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示す)、②式 $B^2-B^3-B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、③式 $B^3-B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、④式 $B^4-B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、⑤式 $B^5-B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、

⑥式 $B^6-B^7-B^8$ (式中、各記号は上記と同意義を示す) または⑦式 B^7-B^8 (式中、各記号は上記と同意義を示す) で表されるペプチド鎖である上記

(4) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(6) B^1 が側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基である上記 (5) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(7) B^1 が側鎖が置換されていてもよい Gly である上記 (6) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(8) B^2 、 B^3 および B^4 がそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基である上記 (5) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(9) B^5 が芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基である上記 (5) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(10) B^6 および B^7 がそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基である上記 (5) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(11) B^8 が側鎖が置換されていてもよい Gln である上記 (5) 記載のペプチド、

(12) Y^1 が (a) 式 $A^1-A^2-A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、 A^1 ないし A^{17} はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示す)、(b) 式 $A^2-A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(c) 式 $A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(d) 式 $A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A$

$9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(e) 式 $A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(f) 式 $A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(g) 式 $A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(h) 式 $A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(i) 式 $A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(j) 式 $A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(k) 式 $A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(l) 式 $A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(m) 式 $A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(n) 式 $A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(o) 式 $A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、(p) 式 $A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す) または (q) A^{17} (A^{17} は前記と同意義を示す) で表されるアミノ酸残基またはペプチド鎖である上記

(4) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(13) A^1 が芳香性の側鎖を有するアミノ酸残基である上記 (12) 記載のアミノ酸残基またはペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(14) A^2 および A^3 が側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基である上記 (12) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(15) A^4 が側鎖が置換されていてもよい中性または塩基性-L-アミノ酸残基である上記 (12) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(16) A^5 が側鎖が置換されていてもよい Pro である上記 (12) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(17) A^6 および A^9 がそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基である上記 (12) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(18) A^7 および A^{10} がそれぞれ同一または異なって、ヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基または置換されていてもよい中性-アミノ酸残基である上記

(12) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(19) A^8 がヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基である上記 (12) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(20) A^8 が Pro または Hyp である上記 (19) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(21) A^{10} がヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基である上記 (12) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(22) A^{11} ないし A^{14} がそれぞれ同一または異なって置換されていてもよい中性アミノ酸残基である上記 (12) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(23) A^{15} が芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基である上記 (12) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(24) A^{15} が Trp である上記 (23) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(25) A^{16} および A^{17} がそれぞれ同一または異なって中性アミノ酸残基である上記 (12) 記載のアミノ酸残基またはペプチドまたはそのエステルまたはそれらの塩、

(26) 上記 (1) 記載のペプチドまたはそのエステルまたはその塩を含有してなる医薬、および

(27) 中枢神経機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、免疫機能調節剤、消化器機能調節剤、代謝機能調節剤または生殖器機能調節剤である上記 (26) 記載の医薬などに関する。

【0007】

さらに、本発明は、

(28) 痴呆、鬱病、多動児（微細脳障害）症候群、意識障害、不安障害、精神分裂症、恐怖症、成長ホルモン分泌障害、過食症、多食症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、高プロラクチン血症、糖尿病、癌、肺炎、腎

疾患、ターナー症候群、神経症、リウマチ関節炎、脊髄損傷、一過性脳虚血発作、筋萎縮性側索硬化症、急性心筋梗塞、脊髄小脳変性症、骨折、創傷、アトピー性皮膚炎、骨粗鬆症、喘息、てんかん、不妊症、動脈硬化、肺気腫、肺水腫、乳汁分泌不全またはエイズなどの疾病の治療・予防剤である上記（26）項記載の医薬などを提供するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明においてアミノ酸残基とは、アミノ酸が水分子を失ってペプチド結合を形成しタンパク質やペプチド中に取り込まれた時のN末端もしくはC末端以外部分の構造をいう。例えば、 α -アミノ酸残基とは α -アミノ酸 ($\text{H}_2\text{NC}(\text{R}^0)(\text{R}^1)\text{COOH}$: R^0 および R^1 はそれぞれ同一または異なって、任意の置換基を示す) が水分子を失ってペプチド結合を形成しタンパク質やペプチド中に取り込まれた時のN末端もしくはC末端以外部分の $-\text{NHC}(\text{R}^0)(\text{R}^1)\text{CO}-$ の構造をいう。一方、N末端のアミノ酸残基は $\text{H}_2\text{NC}(\text{R}^0)(\text{R}^1)\text{CO}-$ 、C末端のアミノ酸残基は $-\text{NHC}(\text{R}^0)(\text{R}^1)\text{COOH}$ で示される。また、 β -アミノ酸 ($\text{H}_2\text{NC}(\text{R}^0)(\text{R}^1)\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)\text{COOH}$: R^0 、 R^1 、 R^2 および R^3 はそれぞれ同一または異なって、任意の置換基を示す) が水分子を失ってペプチド結合を形成しタンパク質やペプチド中に取り込まれた時のN末端もしくはC末端以外部分の $-\text{NHC}(\text{R}^0)(\text{R}^1)\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)\text{CO}-$ の構造をいう。一方、N末端のアミノ酸残基は $\text{H}_2\text{NC}(\text{R}^0)(\text{R}^1)\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)\text{CO}-$ 、C末端のアミノ酸残基は $-\text{NHC}(\text{R}^0)(\text{R}^1)\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)\text{COOH}$ で示される。また、 γ -アミノ酸 ($\text{H}_2\text{NC}(\text{R}^0)(\text{R}^1)\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)\text{COOH}$: R^0 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 および R^5 はそれぞれ同一または異なって、任意の置換基を示す) が水分子を失ってペプチド結合を形成しタンパク質やペプチド中に取り込まれた時のN末端もしくはC末端以外部分の $-\text{NHC}(\text{R}^0)(\text{R}^1)\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)\text{CO}-$ の構造をいう。一方、N末端のアミノ酸残基は $\text{H}_2\text{NC}(\text{R}^0)(\text{R}^1)\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)\text{CO}-$ 、C末端のアミノ酸残基は $-\text{NHC}(\text{R}^0)(\text{R}^1)\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)\text{COOH}$ で示される。さらに、 ϵ -アミノ酸 ($\text{H}_2\text{NC}(\text{R}^0)(\text{R}^1)\text{C}(\text{R}^2)(\text{R}^3)\text{C}(\text{R}^4)(\text{R}^5)\text{C}(\text{R}^6)(\text{R}^7)\text{C}(\text{R}^8)(\text{R}^9)\text{COOH}$: R^0 、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 および R^9 はそれぞれ同一または異なって、任意の置換基を示す) が水分子を失ってペプチド結合を形成しタンパク質やペプチド中に取り込まれた時のN末端もしくはC末端以外部分の-N

HC(R⁰)(R¹)C(R²)(R³)C(R⁴)(R⁵)C(R⁶)(R⁷)C(R⁸)(R⁹)CO-の構造をいう。一方、N末端のアミノ酸残基はH₂NC(R⁰)(R¹)C(R²)(R³)C(R⁴)(R⁵)C(R⁶)(R⁷)C(R⁸)(R⁹)CO-、C末端のアミノ酸残基は-NHC(R⁰)(R¹)C(R²)(R³)C(R⁴)(R⁵)C(R⁶)(R⁷)C(R⁸)(R⁹)COOHで示される。

【0009】

本明細書において、アミノ酸残基としては、天然または非天然のアミノ酸であって、D-体またはL-体のいずれでもよく、α-、β-、γ-、ε-型のいずれのものでもよい。

α-アミノ酸の例としては、例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、システイン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、フェニルアラニン、チロシン、ヒスチジン、トリプトファン、アスパラギン、グルタミン、プロリン、ピペコリン酸、ノルロイシン、γ-メチルロイシン、tert-ロイシン、ノルバリン、ホモアルギニン、ホモセリン、α-アミノイソ酪酸、α-アミノ酪酸、オルニチン、α-アミノアジピン酸、フェニルグリシン、チエニルグリシン、シクロヘキシルグリシン、シクロヘキシルアラニン、チエニルアラニン、ナフチルアラニン、ピフェニルアラニン、p-ホスホノメチルフェニルアラニン、オクタヒドロインドール-2-カルボン酸、O-ホスホチロシン、アダマンチルアラニン、ベンゾチエニルアラニン、ピリジルアラニン、ピペリジルアラニン、ピラジルアラニン、キノリルアラニン、チアゾリルアラニン、ホモシステイン、ホモフェニルアラニン、シトルリン、ホモシトルリン、オキシプロリン、α、β-ジアミノプロピオン酸、α、γ-ジアミノ酪酸、アミノマロン酸、1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、ペニシラミン、シクロロイシン、2-アミノ-4-ペンテン酸などがあげられる。

β-アミノ酸の例としては、例えば、β-アラニン、β-アミノ酪酸、イソアスパラギン、3-アミノアジピン酸、3-アミノフェニルプロピオン酸、3-アミノ2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸、3-アミノノルボルナンカルボン酸、3-アミノピシクロヘプタンカルボン酸などがあげられる。

γ-アミノ酸の例としては、例えば、γ-アミノ酪酸、イソグルタミン、スタ

チン、4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-シクロヘキシルペンタン酸、4-アミノ-3-ヒドロキシ-5-フェニルペンタン酸、6-アミノペニシラン酸、3-アミノアダマンタン-1-カルボン酸などがあげられる。

ϵ -アミノ酸の例としては、例えば、 ϵ -アミノカプロン酸、4-アミノメチル-シクロヘキサシカルボン酸などがあげられる。

【0010】

該天然のアミノ酸としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、スレオニン、システイン、シスチン、メチオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニン、フェニルアラニン、チロシン、ヒスチジン、トリプトファン、アスパラギン、グルタミン、プロリン、などが挙げられる。

非天然のアミノ酸としては、ノルロイシン、 γ -メチルロイシン、tert-ロイシン、ノルバリン、ホモアルギニン、ホモセリン、アミノイソ酪酸、オルニチン、アミノアジピン酸（例、 α -アミノアジピン酸）、フェニルグリシン、チエニルグリシン、シクロヘキシルグリシン、アミノ酪酸、 β -アラニン、シクロヘキシルアラニン、チエニルアラニン、ナフチルアラニン、アダマンチルアラニン、ベンゾチエニルアラニン、ピリジルアラニン、ピペリジルアラニン、ピラジルアラニン、キノリルアラニン、チアゾリルアラニン、イソアスパラギン、イソグルタミン、ホモシステイン、ホモフェニルアラニン、シトルリン、ホモシトルリン、オキシプロリン、ジアミノプロピオン酸、ジアミノ酪酸、アミノ安息香酸、前記天然アミノ酸、非天然アミノ酸のN-メチル化体などが挙げられる。

【0011】

これらのアミノ酸残基の側鎖に置換していてもよい置換基の例としては、(1) C_{1-6} アルキル（例、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、*n*-ペンチルなど、好ましくは C_{1-3} アルキル）、(2)シアノ、(3)ハロゲン（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）、(4)ヒドロキシ- C_{1-6} アルキル（例、ヒドロキシメチル、ヒドロキシエチル）、(5) C_{1-6} アルコキシ（例、メトキシ、エトキシ、*n*-プロポキシ、イソプロポキシ、*n*-ブトキシ、*tert*-ブトキシなど、好ましくは C_{1-3} アル

コキシ)、(6) C_{1-6} アルコキシカルボニル (例、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニルなど、好ましくは C_{1-3} アルコキシカルボニル)、(7) C_{1-4} アシル (例、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリルなどのホルミルおよび C_{2-4} アルカノイル)、(8) ヒドロキシ、(9) 式: $-S(O)_a-R^{21}$ (式中、 a は 0~2 の整数を、 R^{21} は C_{1-6} アルキル (具体例は、上記と同様のものが挙げられる) を示す) で表わされる基 (例、メチルチオ、メタンスルフィニル、メタンスルホニル、エチルチオ、エタンスルフィニル、エタンスルホニルなど)、(10) カルボキシ基、(11) テトラゾリル基、(12) アミノアルキル基、(13) アミノアリル基、(15) チアゾリル基、(16) チエニル基、(17) オキサゾリル基、(18) フリル基、(19) ピラニル基、(20) ピリジル基、(21) ピラジル基、(22) ピラジニル基、(23) ピリミジニル基、(24) ピリダジニル基、(25) インドリル基、(26) インドジニル基、(27) イソインドリル基、(28) ピロリル基、(29) イミダゾリル基、(30) イソチアゾリル基、(31) ピラゾリル基、(32) クロメニル基、(33) ピラゾリル基、(34) プリニル基、(35) キノリジニル基、(36) キノリル基、(37) イソキノリル基、(38) キナゾリニル基、(39) キノキサリニル基、(40) シンノリニル基、(41) モルホリニル基、(42) ベンゾチエニル基、(43) ベンゾフラニル基、(44) ベンズイミダゾリル、(45) ベンズイミダゾリル基、(46) (10) から (45) で置換された C_{1-4} アルキル基、(47) (10) から (45) で置換された C_{1-4} アシル基、(48) (10) から (45) で置換された C_{6-10} アリール基、(49) (10) から (45) で置換された C_{7-12} アラルキル基、(50) C_{7-13} アラルキル基 (ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリル、ナフチルメチル) などがあげられる。

【0012】

特に、前記 A^{11} 、 A^{13} 、 A^{17} が Gly の場合には、Gly の側鎖に置換する置換基は中性、酸性、塩基性、芳香性のいずれのものであってもよい。

中性の置換基としては、(1) C_{1-6} アルキル (例、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチルなど、好ましくは C_{1-3} アルキル)、(2) シアノ、(3) ハロゲン (例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など)、(4) ヒドロキシ- C_{1-6} アルキル (例

、ヒドロキシメチル、ヒドロキシエチル)、 C_{6-10} アリール ((例フェニル、ナフチル、インデニル、クメニル、メシチル、トリル、キシリル、スチレニル) (5)チエニル基、(6)オキサゾリル基、(7)フリル基、(8)インドリル基、(9)インドジニル基、(10)イソインドリル基、(11)上記(2)から(10)に記載の置換基で置換された C_{1-6} アルキル、(12)上記(2)から(10)に記載の置換基で置換された C_{6-10} アリール基、(13) 上記(2)から(10)に記載の置換基で置換された C_{7-15} アラルキル基、などがあげられる。

酸性の置換基としては、カルボキシル基、スルホ基、テトラゾリル基等で置換された C_{1-4} アルキル基、 C_{6-10} アリール基、 C_{7-15} アラルキル基などがあげられる。

塩基性の置換基としては、(1)アミノアルキル基、(2)アミノアリル基、(3)ピリジル基、(4)ピラジル基、(5)ピラジニル基、(6)ピリダジニル基、(7) イミダゾリール基、(8)ピラゾリル基、(9)ピラゾリル基、(10)モルホリニル基、(11) 上記(3)から(10)に記載の置換基で置換された C_{1-4} アルキル基、(12)上記 (3)から(10))に記載の置換基で置換された C_{7-15} アラルキル基、(13)上記(3)から(10)に記載の置換基で置換された C_{6-10} アリール基などがあげられる。

【0013】

本明細書において、酸性アミノ酸残基としては、たとえば、側鎖にカルボキシル基、テトラゾリル基のような酸性基を有するアミノ酸があげられる。その具体例としては、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン酸、ホモシステイン酸、3-(5-テトラゾリル)アラニン、2-アミノ-4-(5-テトラゾリル)酪酸などがあげられる。

本明細書において、塩基性アミノ酸残基としては、たとえば、ヒスチジン、アルギニン、オルチニン、リジン、ジアミノプロピオン酸、ジアミノ酪酸、ホモアルギニンなどがあげられる。

本明細書において、中性アミノ酸残基としては、たとえば、アラニン、バリン、ノルバリン、ロイシン、イソロイシン、アロイソロイシン、ノルロイシン、ターシャリーロイシン、ガンマメチルロイシン、プロリン、フェニルグリシン、フェニルアラニン、グルタミン、アスパラギン、セリン、スレオニン、グリシン、シ

ステイン、メチオニン、トリプトファン、オキシプロリンなどのアミノ酸があげられる。

本明細書において、芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基としては、たとえば、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン、1-ナフチルアラニン、2-ナフチルアラニン、ヒスチジン、ピリジルアラニン、などがあげらる。

本明細書において、ヒドロキシ基を側鎖に有るアミノ酸残基としては、例えば、セリン、スレオニン、チロシン、オキシプロリンなどがあげられる。

【0014】

本明細書におけるペプチドおよびペプチド鎖はペプチド標記の慣例に従って左端がN末端（アミノ末端）、右端がC末端（カルボキシル末端）である。本発明のペプチドおよびペプチド鎖はC末端が通常カルボキシル基（ $-COOH$ ）またはカルボキシレート（ $-COO^-$ ）であるが、C末端がアミド（ $-CONH_2$ ）またはエステル（ $-COOR$ ）であってもよい。エステルのRとしては、例えばメチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、ベンジル、フェネチル、ベンズヒドリルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル、もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキルなどの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチルエステルなどが挙げられる。

本発明のペプチドがC末端以外にカルボキシル基またはカルボキシレートを有している場合、それらの基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この時のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

また、本発明のペプチドまたはペプチド鎖には、N末端のアミノ酸残基のアミノ基が置換基（例えば、①ホルミル、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル、グアニジノアセチル、チエニルアクリリール、ピリジルアセチルなどの C_{1-8} アシル基、②メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル、*tert*-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどの C_{1-6} アルキル基、③フェニル、ナフチルなど C_{6-10} アリール基またはベンジル、フェネチルなどの C_{7-16} アラ

ルキル基、④トシルなどのスルホニル基など)で置換されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など)で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

【0015】

本明細書において、 X^1 は「水素原子またはそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし25個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖」を示す。

該「側鎖が置換されていてもよい1ないし25個のアミノ酸」における置換基としては、例えば、上記の「アミノ酸残基の側鎖に置換していてもよい置換基」と同様のものなどがあげられる。

X^1 が「側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基」を示すときの好ましい例としては、例えば、側鎖が置換されていてもよいピログルタミン酸または側鎖が置換されていてもよいグルタミン酸などがあげられ、より好ましくは、ピログルタミン酸またはグルタミンなどがあげられる。

X^1 が「それぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい2ないし25個のアミノ酸からなるペプチド鎖」を示すときの具体例としては、例えば、式 Y^1-Y^2 (式中、 Y^1 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし17個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖を示し、 Y^2 はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよい1ないし7個のアミノ酸からなるアミノ酸残基またはペプチド鎖を示す)で表されるペプチドなどがあげられる。

上記 Y^1 および Y^2 で表されるアミノ酸残基またはペプチド鎖中のアミノ酸残基の側鎖の置換基としては、例えば、上記の「アミノ酸残基の側鎖に置換していてもよい置換基」と同様のものなどがあげられる。

【0016】

上記 Y^1 としての具体例としては、例えば、

(a) 式 $A^1-A^2-A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、 A^1 ないし A^{17} はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示す)、

(b) 式 $A^2-A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(c) 式 $A^3-A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(d) 式 $A^4-A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(e) 式 $A^5-A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(f) 式 $A^6-A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(g) 式 $A^7-A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(h) 式 $A^8-A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(i) 式 $A^9-A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(j) 式 $A^{10}-A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(k) 式 $A^{11}-A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(l) 式 $A^{12}-A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、

(m) 式 $A^{13}-A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)

- (o) 式 $A^{14}-A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、
 (p) 式 $A^{15}-A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す)、
 (q) 式 $A^{16}-A^{17}$ (式中、各記号は前記と同意義を示す) または
 (r) A^{17} (A^{17} は前記と同意義を示す) で表されるアミノ酸残基またはペプチド鎖などがあげられる。

【0017】

上記 A^1 は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、芳香性の側鎖を有するアミノ酸残基、より好ましくは、芳香性の側鎖を有する L-アミノ酸残基、さらに好ましくは L-チロシンなどを示す。

上記 A^2 および A^3 はそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基、より好ましくは、側鎖が置換されていてもよい L-中性アミノ酸残基、さらに好ましくは A^2 としては L-ロイシンなど、 A^3 としては L-バリンなどがあげられる。

上記 A^4 は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい中性または塩基性アミノ酸残基、より好ましくは、側鎖が置換されていてもよい L-中性または L-塩基性アミノ酸残基、さらに好ましくは L-グルタミンまたは L- α アミノアジピン酸 L-リジンなどを示す。

上記 A^5 は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基、より好ましくは、側鎖が置換されていてもよい L-プロリン、さらに好ましくは、L-プロリンなどを示す。

上記 A^6 および A^9 はそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基、より好ましくは、側鎖が置換されていてもよい L-塩基性アミノ酸残基、さらに好ましくは L-アルギニンなどを示す。

上記 A^8 は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、L-プロリンやヒドロキシ基を側鎖に有するアミノ酸残基、より好ましくは、ヒドロキシ基を側鎖に有する L-アミノ酸残基、さらに好ましくは L-セリンなどを示す。

上記A¹⁰は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、ヒドロキシ基またはカルバモイル基を側鎖に有するアミノ酸残基、より好ましくは、ヒドロキシ基またはカルバモイル基を側鎖に有するL-アミノ酸残基、さらに好ましくはセリン、スレオニン、アスパラギンなどを示す。

上記A¹¹ないしA¹⁴はそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基、より好ましくは、A¹¹としてはグリシン、A¹²としてはL-プロリン、A¹³としてはグリシン、A¹⁴としてはL-アラニン、L-プロリンなどがあげられる。

上記A¹⁵は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基、より好ましくは、芳香族性の側鎖を有するL-アミノ酸残基、さらに好ましくはL-トリプトファンなどを示す。

上記A¹⁶は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、中性アミノ酸残基、より好ましくは、カルバモイル基を持つ中性L-アミノ酸残基、さらに好ましくはL-グルタミンを示す。

A¹⁷は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、中性アミノ酸残基、より好ましくは、グリシンなどを示す。

【0018】

上記Y²としての具体例としては、例えば、

- ① 式 B¹-B²-B³-B⁴-B⁵-B⁶-B⁷-B⁸ (式中、B¹ないしB⁸はそれぞれ同一または異なって側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示す)、
- ② 式 B²-B³-B⁴-B⁵-B⁶-B⁷-B⁸ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、
- ③ 式 B³-B⁴-B⁵-B⁶-B⁷-B⁸ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、
- ④ 式 B⁴-B⁵-B⁶-B⁷-B⁸ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、
- ⑤ 式 B⁵-B⁶-B⁷-B⁸ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、
- ⑥ 式 B⁶-B⁷-B⁸ (式中、各記号は上記と同意義を示す)、
- ⑦ 式 B⁷-B⁸ (式中、各記号は上記と同意義を示す) または
- ⑧ 式 B⁸ (B⁸は上記と同意義を示す) で表されるアミノ酸残基またはペプチド

鎖などがあげられる。

【0019】

上記B¹は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい中性アミノ酸残基、より好ましくは、置換されていてもよい中性-L-アミノ酸残基、さらに好ましくは、側鎖が置換されていてもよいL-グリシン、最も好ましくは、グリシンなどを示す。

上記B²ないしB⁴はそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基、より好ましくは、置換されていてもよい塩基性-L-アミノ酸残基、さらに好ましくは、B²としてはL-アルギニン、B³としてはL-アルギニン、B⁴としては、L-リジンなどを示す。

上記B⁵は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、芳香族性の側鎖を有するアミノ酸残基、より好ましくは、芳香族性の側鎖を有するL-アミノ酸残基、さらに好ましくは、L-フェニルアラニンなどを示す。

上記B⁶およびB⁷はそれぞれ同一または異なって、側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよい塩基性アミノ酸残基、より好ましくは、側鎖が置換されていてもよい塩基性-L-アミノ酸残基、さらに好ましくは、L-アルギニンなどを示す。

上記B⁸は側鎖が置換されていてもよいアミノ酸残基を示すが、好ましくは、側鎖が置換されていてもよいL-グルタミン、より好ましくは、L-グルタミンまたはL-ピログルタミン酸などを示す。

【0020】

本発明のペプチドの具体例としては、例えば、

(1) Leu-Val-Gln-Pro-Arg-Gly-Ser-Arg-Asn-Gly-Pro-Gly-Pro-Trp-Gln-Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe、

(2) Leu-Val-Gln-Pro-Arg-Gly-Ser-Arg-Asn-Gly-Pro-Gly-Pro-Trp-Gln-Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr、

- (3) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe、
- (4) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr、
- (5) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro、
- (6) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle、
- (7) Ac-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr、
- (8) Ac-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro、
- (9) Ac-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle、
- (10) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Ac)-Gly-Pro-Met-Pro-Phe、
- (11) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Me)-Gly-Pro-Met-Pro-Phe、
- (12) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Ac)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe、
- (13) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Me)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe、
- (14) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Tos)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe、
- (15) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Arg(Tos)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe、
- (16) pGlu-Arg-Pro-Arg-Nle-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe、
- (17) pGlu-Arg-Pro-Arg-Nle-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr、
- (18) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Thi、
- (19) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phg、
- (20) pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Pya(2)、
- (21) Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr、
- (22) Leu-Val-Adi-Pro-Arg-Gly-Ser-Arg-Asn-Gly-Pro-Gly-Pro-Trp-Gln-Gly-Gly
-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro
-Phe、
- (23) Leu-Val-Lys(Ac)-Pro-Arg-Thr-Ser-Arg-Thr-Gly-Pro-Gly-Ala-Trp-Gln-Gly
-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle
-Pro-Tyr、
- (24) Tyr-Leu-Val-Lys-Pro-Arg-Thr-Ser-Arg-Thr-Gly-Pro-Gly-Ala-Trp-Gln-Gly
-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle
-Pro-Phe、 および
- (25) Z-pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Ac)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe

などがあげられる。

【0021】

本発明のペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基（例えばアルカリ金属など）や酸（有機酸、無機酸）との塩が用いられるが、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のペプチドは、ヒトや温血動物の組織または細胞からペプチドを精製する方法によって天然型のリガンドを取得した後、後述のペプチド合成法に準じて適宜修飾を加えて製造することができるし、また、天然型のリガンドを原料とせずに、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

なお、天然型のリガンドをヒトや温血動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや温血動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行い、該抽出液を、塩析、透析、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

天然型のリガンドの取得方法は、例えば、特願平10-220853号に記載の方法に準じて取得することができる。

本発明のペプチドは、自体公知のペプチドの合成法に従って製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuecke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New Y

ork (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるペプチドが遊離体である場合は公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0022】

保護されたアミノ酸またはペプチドの縮合に関しては、ペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、トリスフオスフォニウム類、テトラメチルウロニウム類、カルボジイミド類等がよい。トリスフオスフォニウム類としてはベンゾトリアゾル-1-イルオキシトリスピロリジノフオスフォニウムヘキサフルオロフオスフェイト(PyBOP)、プロモトリスピロリジノフオスフォニウムヘキサフルオロフオスフェイト(PyBroP)、テトラメチルウロニウム類としては2-(1H-ベンゾトリアゾル-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレイト、2-(5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレイト、0-(N-スクシミジル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムテトラフルオロボレイト、カルボジイミド類としてはDCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドなどが挙げられる。これらによる縮合にはラセミ化抑制剤(例えば、HONB, HOBt, HOOBtなど)の添加が好ましい。縮合に用いられる溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。たとえば無水または含水のN,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジンなどの三級

アミン類、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃~50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5ないし4倍過剰で用いられる。固相合成の場合にはニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行うことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化して、後の反応に影響を及ぼさないようにすることができる。

【0023】

原料アミノ酸のアミノ基の保護基としては、たとえば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが挙げられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばRとして上記したC₁₋₆アルキル基、C₃₋₈シクロアルキル基、C₇₋₁₄アラルキル基の他、アリル、2-アダマンチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、4-クロロベンジル、フェナシル基およびベンジルオキシカルボニルヒドラジド、ターシャリーブトキシカルボニルヒドラジド、トリチルヒドラジドなどが挙げられる。

【0024】

セリンおよびスレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては例えばアセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基などの炭素から誘導される基などが挙げられる。また、エーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基、テトラヒドロピラニル基、ターシャリーブチル基、トリチル基(Trt)などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、たとえばBzl、2,6-ジクルルベンジル、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリーブチルなどが挙げられる。ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル(Mtr)、DNP、Bom、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが挙げられる。

アルギニンのグアニジノ基の保護基としてはTos、Z、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルフォニル(Mtr)、p-メトキシベンゼンスルフォニル(MBS)、2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルフォニル(Pmc)、メシチレン-2-スルフォニル(Mts)、2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル(Pbf)、Boc、Z、NO₂などが挙げられる。

リジンの側鎖アミノ基の保護基としてはZ、Cl-Z、トリフルオロアセチル、Boc、Fmoc、Trt、Mtr、4,4-ジメチル-2,6-ジオキソサイクロヘキシリデンエイル(Dde)などが挙げられる。

トリプトファンのインドール保護基としてはフォルミル(For)、Z、Boc、Mts、Mtrなどが挙げられる。

アスパラギン、グルタミンの保護基としてはTrt、キサントイル(Xan)、4,4'-ジメトキシベンゾヒドリル(Mbh)、2,4,6-トリメトキシベンジル(Tmob)などが挙げられる。

【0025】

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物、アジド、活性エステル[アルコール(たとえば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、(HOBt)とのエステル]などが挙げられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、たとえば対応する亜リン酸アミドが挙げられる。

保護基の除去(脱離)方法としては、たとえばPd黒あるいはPd炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、臭化トリメチルシラン

(TMSBr)、トリメチルシリルトリフルオロメタンスルホネート、テトラフルオロホウ酸、トリス(トリフルオロ)ホウ素、三臭化ホウ素あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども挙げられる。上記酸処理による脱離反応は一般に $-20^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ の温度で行われるが、酸処理においてはアニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾールのようなカチオン捕捉剤や、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオール等の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基あるいは公知の手段から適宜選択しうる。

ペプチドのアミド体を得る方法としては、アミド体合成用樹脂を用いて固相合成するか又はカルボキシル末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化した後、アミノ基側にペプチド鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いたペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除いたペプチド（またはアミノ酸）とを製造し、この両ペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のペプチドのアミド体を得ることができる。

【0026】

ペプチドのエステル体を得るにはカルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ペプチドのアミド

体と同様にして所望のペプチドのエステル体を得ることができる。

本発明のペプチドは、さらに、機能あるいは性質がよく知られているタンパク質との融合タンパク質であってもよい。

本発明のペプチドは、①本発明のペプチドの有する生理作用の探索、②組換え型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、③中枢神経機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、免疫機能調節剤、消化器機能調節剤、代謝機能調節剤あるいは生殖器機能調節剤などの医薬の開発などに用いることができる。

特に、後述の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒトなどの温血動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

さらに、上記③に関し、本発明のペプチドは中枢神経系、循環器系、心臓、免疫系、消化器系、代謝系または生殖器系などで発現しているG蛋白質共役型レセプター蛋白質がリガンドとして認識するものであるので、安全で低毒性な医薬として有用である。本発明のペプチドは中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、免疫機能調節作用、消化器機能調節作用、代謝機能調節作用あるいは生殖器機能調節作用などに関与していることから、たとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、感染性疾患（例：クロイツフェルトーヤコブ病などの遅発ウイルス感染症など）に起因する痴呆、内分泌性・代謝性・中毒性疾患（例：甲状腺機能低下症、ビタミンB12欠乏症、アルコール中毒、各種薬剤・金属・有機化合物による中毒など）に起因する痴呆、腫瘍性疾患（例：脳腫瘍など）に起因する痴呆、外傷性疾患（例：慢性硬膜下血腫など）に起因する痴呆などの痴呆、鬱病、多動児（微細脳障害）症候群、意識障害、不安障害、精神分裂症、恐怖症、成長ホルモン分泌障害（例：巨人症、末端肥大症など）、過食症、多食症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、高プロラクチン血症、糖尿病（例、糖尿病性合併症、糖尿病性腎

症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症など）、癌（例：乳癌、リンパ性白血病、肺癌、膀胱癌、卵巣癌、前立腺癌など）、肺炎、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、ターナー症候群、神経症、リウマチ関節炎、脊髄損傷、一過性脳虚血発作、筋萎縮性側索硬化症、急性心筋梗塞、脊髄小脳変性症、骨折、創傷、アトピー性皮膚炎、骨粗鬆症、喘息、てんかん、不妊症、動脈硬化、肺気腫、肺水腫または乳汁分泌不全などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。さらに手術後の栄養状態改善剤、昇圧剤などとしても用いることができる。

加えて、HIV感染症、エイズ（AIDS（Acquired Immune Deficiency Syndrome）：後天性免疫不全症候群）などの治療・予防剤として用いることができる。

本発明のペプチドを上述の医薬として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣や腸溶性被膜を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0027】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、シヨ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方

することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0028】

また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えばヒトや哺乳動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、マントヒヒ、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

【0029】

本発明のペプチドの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重 60 kg として）においては、一日につき約 0.1 から 100 mg、好ましくは約 1.0 から 50 mg、より好ましくは約 1.0 から 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では成人の肺気腫患者（体重 60 kg として）への投与においては、一日につき約 0.01 から 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 から 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 から 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当たりに換算した量を投与することができる。

上記本発明のペプチドに対する G 蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、ヒト

や温血動物（例えば、哺乳温血動物（例、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ラット、マウス、モルモット、ウシ、ウマ、ブタ）、鳥類（例、ニワトリ、ハト、アヒル、ガチョウ、ウズラ）など）のあらゆる組織（例えば、下垂体、脾臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など）または細胞などに由来するG蛋白質共役型レセプター蛋白質であって、例えば、特願平10-220853号の配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものであれば如何なるものであってもよい。すなわち、G蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、特願平10-220853号の配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質などの他に、特願平10-220853号の配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と約90～99.9%の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが挙げられる。

これらの蛋白質が示す活性としては、例えばリガンド結合活性、シグナル伝達などが挙げられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、レセプター蛋白質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

【0030】

さらに、G蛋白質共役型レセプター蛋白質には、N末端のMetが保護基（例えば、ホルミル、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、GlnのN端側が生体内で切断され、該Glnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸残基の側鎖が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質の塩としては、上記したペプチドの塩と同様のものが挙げられる。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩またはその部分ペプチドは、ヒトや温血動物の組織または細胞から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、また、前述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。すなわちG蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドの塩としては、上記したペプチドの塩と同様のものが用いられる。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、特願平10-220853号の配列番号：3のアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、組織・細胞由来のcDNA、組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、組織・細胞よりRNA画分を調製したものをを用いて直接自体公知のRT-PCR法によって増幅することもできる。

具体的には、特願平10-220853号の配列番号：3のアミノ酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、特願平10-220853号の配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

【0031】

本発明のペプチドなどの用途について、以下に具体的に説明する。

（1）リガンドペプチド欠乏症の予防・治療剤

G蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）に対する本発明のペプチドが有する作用に応じて、本発明のペプチドをリガンドペプチドまたはG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）欠乏症の予防・治療剤としても使用することができる。例えば、生体内において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）が減少し

ているためにリガンドの生理作用（中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、免疫機能調節作用、消化器機能調節作用、代謝機能調節作用あるいは生殖器機能調節作用など）が期待できない患者がいる場合に、本発明のペプチドを該患者に投与することによって、該患者の生体内のリガンドペプチドの量を増加させ、リガンドペプチドの作用を十分に発揮させることができる。したがって、本発明のペプチドは、安全で低毒性なリガンドペプチド欠乏症の予防・治療剤などとして用いることができる。

【0032】

（2）リガンドペプチドに対するG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）の定量法

本発明のペプチドはG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）またはその塩や該レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩に対して結合性を有しているので、生体内におけるG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）もしくはその塩、または該レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩の濃度を感度良く定量することができる。

この定量法は、例えば競合法と組み合わせることによって用いることができる。

すなわち、被検体を本発明のペプチドと接触させることによって被検体中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）もしくはその塩、またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）の部分ペプチドもしくはその塩の濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の自体公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）

【0033】

（3）G蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）と、本発明のペプチドまたはそれらのアミド、エステルもしくはそれら塩との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法

G蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）またはその塩や該部分ペプチドも

しくはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質（APJ）の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）との結合性を変化させる化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、G蛋白質共役型レセプター（APJ）を介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（即ちG蛋白質共役型レセプターアゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（即ちG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト）などが含まれる。「結合性を変化させる」とは、本発明のペプチドとの結合を阻害する場合と本発明のペプチドとの結合を促進する場合の両方を包含するものである。

すなわち、本発明は、（i）G蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）もしくはその塩または該レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に、本発明のペプチドを接触させた場合と（ii）上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）もしくはその塩または該レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に、本発明のペプチドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のペプチドと上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

本発明のスクリーニング方法においては、（i）上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）または該レセプター蛋白質の部分ペプチドに、本発明のペプチドを接触させた場合と（ii）上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）または該レセプター蛋白質の部分ペプチドに、本発明のペプチドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば該G蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）または該レセプター蛋白質の部分ペプチドに対する本発明のペプチドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

【0034】

本発明のスクリーニング方法は具体的には、

①標識した本発明のペプチドを、上記したG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）もしくはその塩またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）の部分ペプチドまたはその塩に接触させた場合と、標識した本発明のペプチドおよび試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）もしくはその塩またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した本発明のペプチドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識した本発明のペプチドを、G蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合と、標識した本発明のペプチドおよび試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、標識した本発明のペプチドの該細胞または該膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識した本発明のペプチドを、G蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）に接触させた場合と、標識した本発明のペプチドおよび試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）に接触させた場合における、標識した本発明のペプチドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

【0035】

④ G蛋白質共役型レセプター (APJ) を活性化する化合物 (例えば、本発明ペプチド) を G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) を含有する細胞に接触させた場合と、G蛋白質共役型レセプター (APJ) を活性化する化合物および試験化合物を G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター (APJ) を介した細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など) を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドと G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤ G蛋白質共役型レセプター (APJ) を活性化する化合物 (例えば、本発明のペプチドなど) を G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) をコードする DNA を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) に接触させた場合と、G蛋白質共役型レセプター (APJ) を活性化する化合物、および試験化合物を G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) をコードする DNA を含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター (APJ) を介する細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など) を測定し、比較することを特徴とする本発明のペプチドと G蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などである。

【0036】

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる G蛋白質共役型レセプター蛋白質

(APJ)としては、上記のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、ヒトや温血動物の臓器の膜画分などが好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質 (APJ) などが適している。

本発明のスクリーニング方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫または昆虫細胞、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクイレック・アシッツ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、たとえばサッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。

昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)〕。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞〔以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィトロ (in Vitro), 13巻, 213-217頁 (1977年)〕などが用いられる。

動物細胞としては、たとえばサルCOS-7細胞、Vero細胞、チャイニーズハムスター細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (dhfr-CHO細胞)、マウスL細胞、マウス3T3細胞、マウスミエローマ細胞、ヒトHEK293細胞、ヒトFL細胞、293細胞、C127細胞、BALB3T3細胞、Sp-2/O細胞などが用いられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500rpm~3000rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000rpm~30000rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

【0037】

該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のペプチドとG蛋白質共役型レセプターとの結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識した本発明のペプチドが用いられる。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたりガンドなどを利用することができる。

具体的には、本発明のペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質(APJ)を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4～10(望ましくはpH6～8)のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM(花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターや本発明のペプチドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64(ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml～10mlの該レセプター溶液に、一定量(5000cpm～500000cpm)の標識した本発明のペプチドを添加し、同時に $10^{-4} \sim 10^{-1} \mu\text{M}$ の試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知る

ために大過剰の未標識の本発明のペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B_0)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント($B_0 - NSB$)を100%とした時、特異的結合量($B - NSB$)が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

本発明のペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質(APJ)との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞としては、前述の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質(APJ)発現細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0038】

本発明のペプチドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分、および本発明のペプチドを含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution（ギブコ社製）に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。

孔径0.45 μ mのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター（APJ）標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質（APJ）を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに 5×10^5 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識した本発明のペプチド

[³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識した本発明のペプチドを適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。

④本発明のペプチド標準液

本発明のペプチドを0.1%ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

【0039】

2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させた細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、 $490\mu\text{l}$ の測定用緩衝液を各穴に加える。

② $10^{-3}\sim 10^{-10}\text{M}$ の試験化合物溶液を $5\mu\text{l}$ 加えた後、標識した本発明のペプチドを $5\mu\text{l}$ 加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに 10^{-3}M のリガンドを $5\mu\text{l}$ 加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した本発明のペプチドを $0.2\text{N NaOH}-1\%\text{SDS}$ で溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

【数1】

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B_0 : 最大結合量

【0040】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のペプチドとG蛋白質共役型レセプター（APJ）との結合を変化させる（結合を阻害あるいは促進する）化合物であり、具体的にはG蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆるG蛋白質共役型レセプターアゴニスト）、あるいは該刺激活性を有しない化合物（いわゆるG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト）である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記G蛋白質共役型レセプターアゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の(i)または(ii)に従えばよい。

(i) 前記①～③のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のペプチドとG蛋白質共役型レセプターとの結合性を変化させる(特に、結合を阻害する)化合物を得た後、該化合物が上記したG蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はG蛋白質共役型レセプターアゴニストであり、該活性を有しない化合物またはその塩はG蛋白質共役型レセプターアンタゴニストである。

(ii) (a) 試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させ、上記G蛋白質共役型レセプターを介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩はG蛋白質共役型レセプターアゴニストである。

(b) G蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物(例えば、本発明のペプチドまたはG蛋白質共役型レセプターアゴニストなど)をG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、G蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物および試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介した細胞刺激活性を測定し、比較する。G蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩はG蛋白質共役型レセプターアンタゴニストである。

該G蛋白質共役型レセプターアゴニストは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する本発明のペプチドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、本発明のペプチドと同様に安全で低毒性な医薬として有用である。

逆に、G蛋白質共役型レセプターアンタゴニストは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する本発明のペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、該レセプター活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のペプチドは中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、免疫機能調節作用、消化器機能調節作用、代謝機能調節作用あるいは生殖

器機能調節作用などに関与していることから、上記したアゴニストあるいはアンタゴニストをたとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、感染性疾患（例：クロイツフェルト・ヤコブ病などの遅発ウイルス感染症など）に起因する痴呆、内分泌性・代謝性・中毒性疾患（例：甲状腺機能低下症、ビタミンB12欠乏症、アルコール中毒、各種薬剤・金属・有機化合物による中毒など）に起因する痴呆、腫瘍性疾患（例：脳腫瘍など）に起因する痴呆、外傷性疾患（例：慢性硬膜下血腫など）に起因する痴呆などの痴呆、鬱病、多動児（微細脳障害）症候群、意識障害、不安障害、精神分裂症、恐怖症、成長ホルモン分泌障害（例：巨人症、末端肥大症など）、過食症、多食症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、高プロラクチン血症、低血糖症、下垂体機能低下症、下垂体性小人症、糖尿病（例：糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症など）、癌（例：乳癌、リンパ性白血病、肺癌、膀胱癌、卵巣癌、前立腺癌など）、肺炎、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎など）、ターナー症候群、神経症、リウマチ関節炎、脊髄損傷、一過性脳虚血発作、筋萎縮性側索硬化症、急性心筋梗塞、脊髄小脳変性症、骨折、創傷、アトピー性皮膚炎、骨粗鬆症、喘息、てんかん、不妊症、動脈硬化、肺気腫、肺水腫または乳汁分泌不全などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。さらに催眠鎮静剤、手術後の栄養状態改善剤、昇圧剤、降圧剤などとしても用いることができる。

加えて、HIV感染症、エイズ（AIDS（Acquired Immune Deficiency Syndrome）：後天性免疫不全症候群）などの治療・予防剤として用いることができる。

上記のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物の塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩などが用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などがあげられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩、な

らびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などがあげられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6-ピリジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N, N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩あげられる。

無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸などとの塩があげられる。

有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸などとの塩があげられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルチニンなどとの塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩があげられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬として使用する場合、上記の本発明のペプチドを医薬として実施する場合と同様にして実施することができる。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

【0041】

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
Y	: チミンまたはシトシン

N	: チミン、シトシン、アデニンまたはグアニン
R	: アデニンまたはグアニン
M	: シトシンまたはアデニン
W	: チミンまたはアデニン
S	: シトシンまたはグアニン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム

【0042】

EIA	: エンザイムイムノアッセイ
GlyまたはG	: グリシン
AlaまたはA	: アラニン
ValまたはV	: バリン
LeuまたはL	: ロイシン
IleまたはI	: イソロイシン
SerまたはS	: セリン
ThrまたはT	: スレオニン
CysまたはC	: システイン
MetまたはM	: メチオニン
GluまたはE	: グルタミン酸
AspまたはD	: アスパラギン酸
LysまたはK	: リジン
ArgまたはR	: アルギニン

HisまたはH : ヒスチジン
 PheまたはF : フェニルアラニン
 TyrまたはY : チロシン
 TrpまたはW : トリプトファン

ProまたはP : プロリン

AsnまたはN : アスパラギン

GlnまたはQ : グルタミン

pGlu : ピログルタミン酸

Me : メチル基

Et : エチル基

Bu : ブチル基

Ph : フェニル基

【0043】

Nle : ノルロイシン

Thi : 2-チエニルアラニン

Phg : フェニルグリシン

Pya (2) : 2-ピリジルアラニン

Adi : α -アミノアジピン酸

Hyp : ヒドロキシプロリン

Ac-Arg : N^{α} -アセチルアルギニン

Lys (Ac) : N^{ϵ} -アセチルリジン

Lys (Me) : N^{ϵ} -メチルリジン

Lys (Tos) : N^{ϵ} -トシルリジン

Arg (Tos) : N^{ϵ} -トシルアルギニン

【0044】

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

Tos : p-トルエンスルフォニル

HONB : N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド

Bz1	: ベンジル
Z	: ベンジルオキシカルボニル
Br-Z	: 2-ブロモベンジルオキシカルボニル
Cl-Z	: 2-クロルベンジルオキシカルボニル
Boc	: t-ブチルオキシカルボニル
HOBT	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
DCC	: N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
TFA	: トリフルオロ酢酸
Fmoc	: N-9-フルオレニルメトキシカルボニル
DNP	: ジニトロフェニル
Bum	: ターシャリーブトキシメチル
Trt	: トリチル
Pbf	: 2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホニル
HOObt	: 3-ヒドロキシ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-1,2,3-ベンゾトリアジン
TfE	: トリフルオロエタノール
HOAt	: 1-ヒドロキシ-7-アザベンゾトリアゾール
PyBrop	: ブロモトリスピロリジノホスホニウム ヘキサフルオロホスフェイト
TMS-Br	: 臭化トリメチルシリル
TC	: チアゾリジン-4(R)-カルボキサミド基
Bom	: ベンジルオキシメチル
NMP	: N-メチルピロリドン
PAM	: フェニルアセトアミドメチル
DCM	: ジクロロメタン
DMF	: N,N-ジメチルホルムアミド
DIEA	: N,N-ジイソプロピルエチルアミン
Clt	: 2-クロロトリチル
For	: ホルミル

【0045】

【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0046】

【実施例1】 Leu-Val-Gln-Pro-Arg-Gly-Ser-Arg-Asn-Gly-Pro-Gly-Pro-Trp-Gln-Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Pheの製造

市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.3mmol/g) に Fmoc-Phe-OH を導入した Fmoc-Phe-O-Clt resin (0.32mmol/g) 0.25mmol分をペプチド合成機 ABI 433A の反応曹に入れ、Fmoc/DCC/HOBt法を用い、固相合成を行った。Fmocアミノ酸の側鎖保護基はArgにはPbf基、SerにtBu基、Trp、LysにBoc基、His、Asn、GlnにTrt基を用いた。他のアミノ酸は側鎖無保護のものを用い、上記に示す配列のPheからN末端方向へ順にLeuまでペプチド鎖を導入し、目的の保護ペプチド樹脂を得た。

この樹脂50mg(4.45mmol)をTFA, thioanisole, m-cresol, H₂O, ethanedithiol (8:2.5:5:5:5:2.5)の混合液1ml中で室温、2時間攪拌した後、反応溶液にエーテルを加え、白色粉末を析出させ遠心分離後、上清を除く操作を3回繰り返した。残渣を水で抽出後、凍結乾燥し白色粉末を23.1mg得た。得られた粗ペプチドをTSK GEL ODS 120T カラム(20 x 300mm)を用いた分取HPLCで、A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B: 85/15~75/25への直線型濃度勾配溶出(60分)を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末10.2mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 4176.0 (計算値4176.3)

HPLC溶出時間 17.8 分

溶出条件

カラム YMC A-301-3 (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100/0~50/50へ 直線型濃度勾配溶出(25分)

流速 1.0ml/分

【0047】

【実施例2】 Leu-Val-Gln-Pro-Arg-Gly-Ser-Arg-Asn-Gly-Pro-Gly-Pro-Trp-Gln-Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyrの製造

実施例1の2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.3mmol/g)に導入するアミノ酸をFmoc-Tyr(tBu)-OHに変更し同様に合成、精製を行い、目的物を凍結乾燥白色粉末13.3mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 4192.0 (計算値4192.3)

HPLC溶出時間 16.9 分

溶出条件

カラム YMC A-301-3 (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100/0~50/50へ直線型濃度勾配溶出(25分)

流速 1.0ml/分

【0048】

【実施例3】 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Pheの製造
市販 2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.3mmol/g) にFmoc-Gly-OH を導入した Fmoc-Gly-O-Clt resin(0.392mmol/g) 0.25mmol分をペプチド合成機ABI 433A の反応曹に入れ、Fmoc/ DCC/ HOBt法を用い、Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-His(Trt), Fmoc-Ser(tBu), Fmoc-Leu, Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Pro, Fmoc-Arg(Pbf), Boc-Glnの順に導入し、目的の保護ペプチド樹脂を得た。

この樹脂1gを、AcOH: TFE: DCM (1:2:7) 20ml中で室温、2時間攪拌した後、濾過によって樹脂を除き、溶媒を留去しエーテルで結晶化し、保護ペプチド (Boc-Gln-Arg(Pbf)-Pro-Arg(Pbf)-Leu-Ser(tBu)-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-OH) 362mgを得た。

H-Phe-OBzl·HClにBoc-Pro, Boc-Nle, Boc-Proを順に縮合しBoc-Pro-Nle-Pro-Phe-Bzlを180mg得た。

Boc-Gln-Arg(Pbf)-Pro-Arg(Pbf)-Leu-Ser(tBu)-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-OH 50mgとHOAt 3.96mgをDCM:DMF(4:1) 700mlに溶かし、氷冷下にDIEA 19.7ml, PyBrop 1

3.5mg, H-Pro-Nle-Pro-Phe-OBzl·HCl (Boc-Pro-Nle-Pro-Phe-Bzlを4N-HCl/ジオキサンで処理し調製) 18.2mgを加えた後、氷浴を取り、室温で1hr攪拌した。クエン酸結晶を溶液に加え中和した後、溶媒を留去、水を加え析出した固体をクロロホルムで抽出した。1N 塩酸、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、溶媒を留去しエーテルを加え粉末を濾取、さらに酢酸エチルとエーテルから再沈殿精製しBoc-Gln-Arg(Pbf)-Pro-Arg(Pbf)-Leu-Ser(tBu)-His(Trt)-Lys(Boc)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OBzl 56mgを得た。

これをthioanisole 982 μ l, m-cresol 110 μ l, triisopropylsilane 215 μ l, TFA 4ml中で室温90分攪拌した後TMS-Br 1.1mlを加え、氷冷下1時間攪拌後、氷浴を外し20℃の水浴上でさらに1hr攪拌した。反応後、反応溶液を留去し、残渣にエーテルを加え、白色粉末を析出させ遠心分離後、上清を除く操作を3回繰り返した。残渣を水で抽出後、凍結乾燥し白色粉末を得た。続いて、得られた粉末を80%AcOHに溶解、70℃で2hr加温後、溶液を水で希釈し凍結乾燥した。得られた粗ペプチドをTSK GEL ODS 120T カラム(20 x 300mm)を用いた分取HPLCで、A液: 0.1% TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B: 80/29~70/30への直線型濃度勾配溶出(60分)を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末14mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1515.7 (計算値1515.9)

HPLC溶出時間 16.8 分

溶出条件

カラム Wakosil 5C18T (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 95/5~45/55へ直線型濃度勾配溶出(25分)

流速 1.0ml/分

【0049】

【実施例4】 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyrの製造
実施例3のH-Phe-OBzl·HClをH-Tyr(Bzl)-OBzl·HClに代え同様の方法で合成、精製を行い白色粉末29mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1532.0 (計算値1531.9)

HPLC溶出時間 14.6 分

溶出条件

カラム Wakosil 5C18T (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 95/5~45/55へ直線型濃度勾配溶出(25分)

流速 1.0ml/分

【0050】

【実施例5】 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Proの製造

実施例3のH-Phe-OBzl·HClをH-Pro-OBzl·HClに代え合成したBoc-Pro-Nle-Pro-OBzlを用い同様に合成、精製し白色粉末8mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1368.4 (計算値1368.8)

HPLC溶出時間 13.8 分

溶出条件

カラム Wakosil 5C18T (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 95/5~45/55へ直線型濃度勾配溶出(25分)

流速 1.0ml/分

【0051】

【実施例6】 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle

実施例3のH-Phe-OBzl·HClをH-Nle-OBzl·HClに代え合成したBoc-Pro-Nle-OBzlを用い同様に合成、精製し白色粉末9mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1272.0 (計算値1271.7)

HPLC溶出時間 12.9 分

溶出条件

カラム Wakosil 5C18T (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 95/5~45/55へ直線型濃度勾配溶出(25分)

流速 1.0ml/分

【0052】

【実施例7】Ac-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyrの製造
市販Boc-Tyr(Br-Z)-OCH₂-PAM樹脂 (0.69 m mole/g resin) 0.5 m mole 分をペプチド合成機ABI 430Aの反応曹に入れ、Boc-strategy (NMP-HOBt) ペプチド合成方法でBoc-Pro, Boc-Nle, Boc-Pro, Boc-Gly, Boc-Lys(Gl-Z), Boc-His(Bom), Boc-Ser(Bzl), Boc-Leu, Boc-Arg(Tos), Boc-Pro, Boc-Arg(Tos)を順に導入し、最終のBoc基を除去後無水酢酸でアセチル化し目的の保護ペプチド樹脂を得た。

この樹脂0.25 g をp-クレゾール0.46 g と共に無水弗化水素5 ml中、0℃ 60分攪拌した後、弗化水素を減圧留去し、残留物にジエチルエーテルを加え沈殿を濾取後、酢酸水に抽出した。抽出液を十分に濃縮後、蒸留水とジエチルエーテルを加え分液抽出し、水層を集め凍結乾燥し、少量の50%酢酸水に溶解後、同溶媒で充填したセファデックスTMG-25カラム (2.0 x 80 cm)に付し、同溶媒で展開、主要画分を集め凍結乾燥し、白色粉末53mgを得た。此れをLiChroprepTMRP-18を充填した逆相クロマトカラム (2.6 x 60 cm)に付け0.1%TFA水 200mlで洗浄、0.1%TFA水 300mlと0.1%TFA含有33%アセトニトリル水 300mlを用いた線型勾配溶出を行い、アセトニトリル濃度20%前後の画分を集め凍結乾燥し、白色粉末30mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1462.4 (計算値 1462.8)

【0053】

【実施例8】Ac-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Proの製造
市販Boc-Pro-OCH₂-PAM樹脂に配列アミノ酸を順に導入し実施例7と同様に合成、精製を行い目的物の白色粉末73mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1299.5 (計算値 1299.8)

【0054】

【実施例9】Ac-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nleの製造
市販ペプチド合成用クロロメチル樹脂にBoc-Nleを導入した(0.57mmol/g)。これを用い実施例7と同様に合成、精製を行い目的物の白色粉末29mgを得た。

質量分析による(M+H)⁺ 1202.9 (計算値 1202.7)

【0055】

【実施例 10】 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Ac)-Gly-Pro-Met-Pro-Pheの製造

市販Boc-Phe-OCH₂-PAM樹脂 (0.72 m mole/g resin)を用いBoc-Lys(Cl-Z)をBoc-Lys(Ac)にまたBoc-NleをBoc-Metに変更し、実施例7と同様に配列順にアミノ酸を導入した。最後のアセチル化に代えZ-pGluを各Boc-アミノ酸と同様の条件で導入した。この樹脂を実施例7と同様に弗化水素処理、精製し目的物の白色粉末70mgを得た。

質量分析による (M+H)⁺ 1575.5 (計算値 1575.8)

【0056】

【実施例 11】

pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Me)-Gly-Pro-Met-Pro-Pheの製造

実施例10のBoc-Lys(Ac)をBoc-Lys(Me·Boc)に代え同様に合成、精製し目的物の白色粉末35mgを得た。

質量分析による (M+H)⁺ 1547.5 (計算値1547.8)

【0057】

【実施例 12】 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Ac)-Gly-Pro-Nle-Pro-Pheの製造

実施例10のBoc-MetをBoc-Nleに代え同様に合成、精製し目的物の白色粉末58mgを得た。

質量分析による (M+H)⁺ 1558.1 (計算値 1557.9)

【0058】

【実施例 13】 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Me)-Gly-Pro-Nle-Pro-Pheの製造

実施例11のBoc-MetをBoc-Nleに代え同様に合成、精製し目的物の白色粉末58mgを得た。

質量分析による (M+H)⁺ 1529.6 (計算値 1529.9)

【0059】

【実施例 14】 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Tos)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe
の製造

実施例 12 の Boc-Lys(Ac) を Boc-Lys(Tos) に代え同様に合成、精製し目的物の白色
粉末 60 m g を得た。

質量分析による $(M+H)^+$ 1670.2 (計算値 1669.9)

【0060】

【実施例 15】 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Arg(Tos)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe
の製造

実施例 1 と同じ Fmoc-Phe-O-Clt resin を用い、目的配列アミノ酸を同様に導入
した。Fmoc アミノ酸の側鎖保護基は最初に導入する Arg のみ Tos 基を用い他は Pbf
基を、Ser には tBu 基を、Trp、Lys には Boc 基を、His、Asn、Gln には Trt 基を用い
た。他のアミノ酸は側鎖無保護のものを、又 pGlu は保護する事無く用い実施例 1
と同様の方法で合成、精製し目的物の白色粉末 40 m g を得た。

質量分析による $(M+H)^+$ 1697.7 (計算値 1697.9)

【0061】

【実施例 16】 pGlu-Arg-Pro-Arg-Nle-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe の製造
実施例 15 と同じ方法でかつ Arg の側鎖保護基にはすべて Pbf を用い同様の方法で
合成、精製し目的物の白色粉末 66 m g を得た。

質量分析による $(M+H)^+$ 1515.8 (計算値 1515.9)

【0062】

【実施例 17】 pGlu-Arg-Pro-Arg-Nle-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr の製造
実施例 7 の Boc-Tyr(Br-Z)-OCH₂-PAM 樹脂 (0.69 m mole/g resin) を用い、実施例
10 の Boc-Lys(Ac) を Boc-Lys(Cl-Z) に Boc-Leu を Boc-Nle に代え同様の方法で合成
、精製し目的物の白色粉末 37 m g を得た。

質量分析による $(M+H)^+$ 1531.6 (計算値 1531.9)

【0063】

【実施例 18】 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Thi の製造
実施例 3 の Phe を Thi に代え同様の方法で合成、精製し目的物の白色粉末 21 m g を

得た。

質量分析による $(M+H)^+$ 1521.7 (計算値 1521.8)

【0064】

【実施例 19】 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phg の製造
実施例 3 の Phe を Phg に代え同様の方法で合成、精製し目的物の白色粉末 16 mg を得た。

質量分析による $(M+H)^+$ 1501.4 (計算値 1501.8)

【0065】

【実施例 20】 pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Pya(2) の製造
実施例 3 の Phe を Pya(2) に代え同様の方法で合成、精製し目的物の白色粉末 25 mg を得た。

質量分析による $(M+H)^+$ 1516.7 (計算値 1516.9)

【0066】

【実施例 21】 Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr の製造
実施例 7 のアセチル化を行う事無く樹脂を弗化水で処理し、実施例と同様に精製し目的物の白色粉末 85 mg を得た。

質量分析による $(M+H)^+$ 1421.0 (計算値 1420.8)

【0067】

【実施例 22】 Leu-Val-Adi(NH₂)-Pro-Arg-Gly-Ser-Arg-Asn-Gly-Pro-Gly-Pro-Trp-Gln-Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe の製造

実施例 10 と同じ樹脂を用い、側鎖保護基として、Lys には Cl-Z 基を、His には Bom 基を、Ser には Bzl 基を、Arg には Tos 基を、Trp には For 基を用い配列順に Boc-アミノ酸を導入した。これを p-クレゾール、1,4-ブタンジチオール共存下、弗化水素処理し、実施例と同様に精製し目的物の白色粉末 20 mg を得た。

質量分析による $(M+H)^+$ 4190.1 (計算値 4190.4)

【0068】

【実施例 23】 Leu-Val-Lys(Ac)-Pro-Arg-Thr-Ser-Arg-Thr-Gly-Pro-Gly-Ala-Trp-Gln-Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Tyr の製造

実施例 7 と同じ樹脂を用い、側鎖保護基として最初の Lys のみ Ac 基、他は Cl-Z 基を、His には Bom 基を、Ser には Bzl 基を、Arg には Tos 基を、Trp には For 基を用い配列順に Boc-アミノ酸を導入し、実施例 22 と同様に脱保護、精製し目的物の白色粉末 24mg を得た。

質量分析による $(M+H)^+$ 4234.2 (計算値 4234.4)

【0069】

【実施例 24】 Tyr-Leu-Val-Lys-Pro-Arg-Thr-Ser-Arg-Thr-Gly-Pro-Gly-Ala-Trp-Gln-Gly-Gly-Arg-Arg-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe の製造

Fmoc アミノ酸の側鎖保護基は Arg には Pbf 基、Ser、Thr、Tyr に tBu 基、Trp、Lys に Boc 基、His、Asn、Gln に Trt 基を用い実施例 1 と同様に合成、精製し目的物の白色粉末 17mg を得た。

質量分析による $(M+H)^+$ 4344.6 (計算値 4344.5)

【0070】

【実施例 25】 Z-pGlu-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys(Ac)-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe の製造

実施例 15 の Arg(Tos) を Lys(Ac) に、pGlu を Z-pGlu に代え、同様に合成、精製し目的物の白色粉末 67mg を得た。

質量分析による $(M+H)^+$ 1692.2 (計算値 1691.9)

【0071】

【実験例 1】

実施例 3、4 のペプチドおよび実施例 1 の対応天然型ペプチド（即ち非天然アミノ酸 Nle が Met に置換されたペプチド）のそれぞれを滅菌蒸留水を用いて 1×10^{-3} M の濃度に溶解した後、0.1% BSA を含むサイトセンサー用培地を用いて段階的に希釈したものを調製した。特開平 10-220853 号と同様にして準備し

た A10 受容体 cDNA 導入 CHO 細胞をサイトセンサーのワークステーションにセットし、各細胞の Acidification Rate が安定したところでペプチド希釈液をサイトセンサーの流路の一つに導入し、流路の切り替えによって細胞に 1 分 2 秒間作用させた。細胞の反応が最大となった時点の Acidification Rate の変化量を Basal level の値を 100% として算出し、その結果を図 1 に示した。

【0072】

【配列表】

【配列番号：1】

配列の長さ：36

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：34

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Leu Val Gln Pro Arg Gly Ser Arg Asn Gly Pro Gly Pro Trp Gln Gly

1

5

10

15

Gly Arg Arg Lys Phe Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly

20

25

30

Pro Xaa Pro Phe

35

【0073】

【配列番号：2】

配列の長さ：36

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：34

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Leu Val Gln Pro Arg Gly Ser Arg Asn Gly Pro Gly Pro Trp Gln Gly

1 5 10 15

Gly Arg Arg Lys Phe Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly

20 25 30

Pro Xaa Pro Tyr

35

【0074】

【配列番号：3】

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：pGlu

存在位置：11

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Phe

1 5 10

【0075】

【配列番号：4】

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：pGlu

存在位置：11

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Tyr

1

5

10

【0076】

【配列番号：5】

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：pGlu

存在位置：11

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro

1 5 10

【0077】

【配列番号：6】

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：pGlu

存在位置：11

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa

1 5 10

【0078】

【配列番号：7】

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：Ac-Arg

存在位置：10

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Xaa Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Tyr

1 5 10

【0079】

【配列番号：8】

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：Ac-Arg

存在位置：10

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Xaa Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro

1 5 10

【0080】

【配列番号：9】

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：Ac-Arg

存在位置：10

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Xaa Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa

1 5 10

【0081】

【配列番号：10】

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：pGlu

存在位置：8

特徴を決定した方法：E

他の情報：Lys(Ac)

配列

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Met Pro Phe

1 5 10

【0082】

【配列番号：11】

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：pGlu

存在位置：8

特徴を決定した方法：E

他の情報：Lys(Me)

配列

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Met Pro Phe

1 5 10

【0083】

【配列番号：12】

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：pGlu

存在位置：8

特徴を決定した方法：E

他の情報：Lys(Ac)

存在位置：11

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Xaa Pro Phe

1 5 10

【0084】

【配列番号：13】

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：pGlu

存在位置：8

特徴を決定した方法：E

他の情報：Lys(Me)

存在位置：11

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Xaa Pro Phe

1 5 10

【0085】

【配列番号：14】

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：pGlu

存在位置：8

特徴を決定した方法：E

他の情報：Lys(Tos)

存在位置：11

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Xaa Pro Phe

1 5 10

【0086】

【配列番号：15】

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：pGlu

存在位置：8

特徴を決定した方法：E

他の情報：Arg(Tos)

存在位置：11

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Xaa Pro Phe

1 5 10

【0087】

【配列番号：16】

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：pGlu

存在位置：5

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

存在位置：11

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Xaa Arg Pro Arg Xaa Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Phe

1 5 10

【0088】

【配列番号：17】

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報 : pGlu

存在位置 : 5

特徴を決定した方法 : E

他の情報 : Nle

存在位置 : 1 1

特徴を決定した方法 : E

他の情報 : Nle

配列

Xaa Arg Pro Arg Xaa Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Tyr

1 5 10

【0089】

【配列番号 : 18】

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

配列の特徴 :

存在位置 : 1

特徴を決定した方法 : E

他の情報 : pGlu

存在位置 : 1 1

特徴を決定した方法 : E

他の情報 : Nle

存在位置 : 1 3

特徴を決定した方法 : E

他の情報 : Thi

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Xaa

1 5 10

【0090】

【配列番号：19】

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：pGlu

存在位置：11

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

存在位置：13

特徴を決定した方法：E

他の情報：Phg

配列

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Xaa

1

5

10

【0091】

【配列番号：20】

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：pGlu

存在位置：1 1

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

存在位置：1 3

特徴を決定した方法：E

他の情報：Pya(2)

配列

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Xaa Pro Xaa

1 5 10

【0092】

【配列番号：21】

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：10

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Nle Pro Tyr

1 5 10

【0093】

【配列番号：22】

配列の長さ：36

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置 : 3

特徴を決定した方法 : E

他の情報 : Adi

存在位置 : 3 4

特徴を決定した方法 : E

他の情報 : Nle

配列

Leu Val Xaa Pro Arg Gly Ser Arg Asn Gly Pro Gly Pro Trp Gln Gly

1 5 10 15

Gly Arg Arg Lys Phe Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly

20 25 30

Pro Xaa Pro Phe

35

【0094】

【配列番号 : 23】

配列の長さ : 36

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 :

存在位置 : 3

特徴を決定した方法 : E

他の情報 : Lys(Ac)

存在位置 : 3 4

特徴を決定した方法 : E

他の情報 : Nle

配列

Leu Val Xaa Pro Arg Thr Ser Arg Thr Gly Pro Gly Ala Trp Gln Gly

1 5 10 15

Gly Arg Arg Lys Phe Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly

20

25

30

Pro Xaa Pro Tyr

35

【0095】

【配列番号：24】

配列の長さ：36

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：35

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Tyr Leu Val Lys Pro Arg Thr Ser Arg Thr Gly Pro Gly Ala Trp Gln

1

5

10

15

Gly Gly Arg Arg Lys Phe Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys

20

25

30

Gly Pro Xaa Pro Phe

35

【0096】

【配列番号：25】

配列の長さ：13

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：

存在位置：1

特徴を決定した方法：E

他の情報：Z-pGlu

存在位置：8

特徴を決定した方法：E

他の情報：Lys(Ac)

存在位置：11

特徴を決定した方法：E

他の情報：Nle

配列

Xaa Arg Pro Arg Leu Ser His Xaa Gly Pro Xaa Pro Phe

1

5

10

【0097】

【発明の効果】

本発明のペプチドは中枢神経機能調節作用、循環機能調節作用、心臓機能調節作用、免疫機能調節作用、消化器機能調節作用、代謝機能調節作用あるいは生殖器機能調節作用などに関与していることから、上記したアゴニストあるいはアンタゴニストをたとえば老人性痴呆、脳血管性痴呆、系統変成型の退行変成疾患（例：アルツハイマー病、パーキンソン病、ピック病、ハンチントン病など）に起因する痴呆、感染性疾患（例：クロイツフェルトーヤコブ病などの遅発ウイルス感染症など）に起因する痴呆、内分泌性・代謝性・中毒性疾患（例：甲状腺機能低下症、ビタミンB12欠乏症、アルコール中毒、各種薬剤・金属・有機化合物による中毒など）に起因する痴呆、腫瘍性疾患（例：脳腫瘍など）に起因する痴呆、外傷性疾患（例：慢性硬膜下血腫など）に起因する痴呆などの痴呆、鬱病、多動児（微細脳障害）症候群、意識障害、不安障害、精神分裂症、恐怖症、成長ホルモン分泌障害（例：巨人症、末端肥大症など）、過食症、多食症、高コレステロール血症、高グリセリド血症、高脂血症、高プロラクチン血症、低血糖症、下垂体機能低下症、下垂体性小人症、糖尿病（例：糖尿病性合併症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症など）、癌（例：乳癌、リンパ性白血病、肺癌、膀胱癌、卵巣癌、前立腺癌など）、肺炎、腎疾患（例：慢性腎不全、腎炎

など)、ターナー症候群、神経症、リウマチ関節炎、脊髄損傷、一過性脳虚血発作、筋萎縮性側索硬化症、急性心筋梗塞、脊髄小脳変性症、骨折、創傷、アトピー性皮膚炎、骨粗鬆症、喘息、てんかん、不妊症、動脈硬化、肺気腫、肺水腫または乳汁分泌不全などの疾病の治療・予防剤として用いることができる。さらに催眠鎮静剤、手術後の栄養状態改善剤、昇圧剤、降圧剤などとしても用いることができる。

加えて、HIV感染症、エイズ(AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) : 後天性免疫不全症候群)などの治療・予防剤として用いることができる。

【0098】

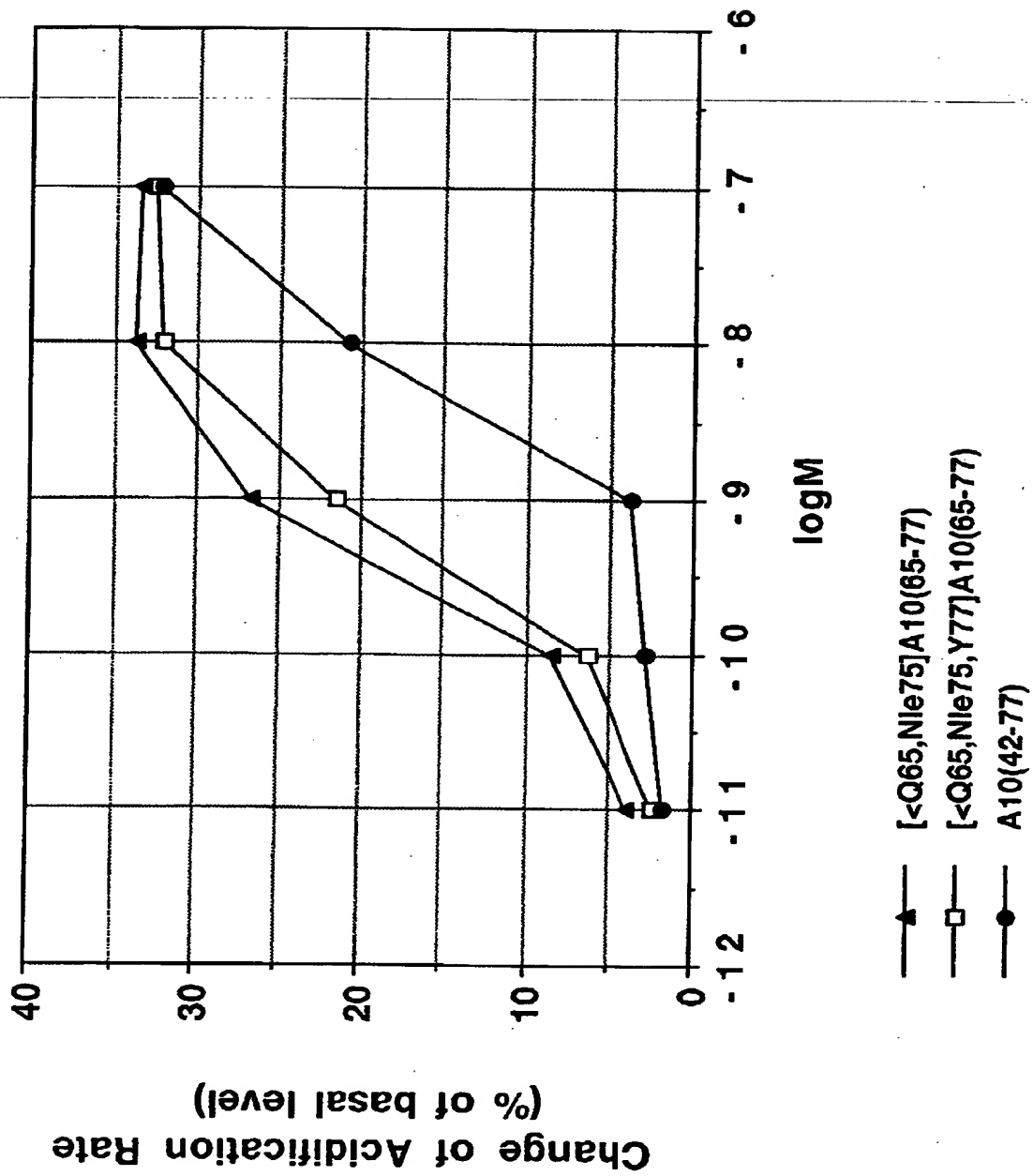
【図面の簡単な説明】

【図1】実施例3, 4のペプチドおよび実施例1の対応天然型ペプチドのAcidification Rateの変化量を示す図を示す。

図中、▲-▲は実施例3で得られたペプチドのAcidification Rateの変化量、□-□は実施例4で得られたペプチドのAcidification Rateの変化量、●-●は実施例1の対応天然型ペプチドのAcidification Rateの変化量を示す。

【書類名】 図面

【図 1】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】新規ペプチドおよびその用途の提供。

【解決手段】本発明は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質がリガンドとして認識する新規ペプチドに関する。

本発明のペプチド等は、①組換え型レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、②中枢機能調節剤、循環機能調節剤、心臓機能調節剤、免疫機能調節剤、消化器機能調節剤、代謝機能調節剤または生殖器機能調節剤などの医薬の開発等に用いることができる。

【選択図】なし

【書類名】 職権訂正データ
 【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100073955

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号

武田薬品工業株式会社大阪工場内

【氏名又は名称】 朝日奈 忠夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100077012

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85 武田

薬品工業株式会社内

【氏名又は名称】 岩谷 龍

【選任した代理人】

【識別番号】 100110456

【住所又は居所】 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目17番85号

武田薬品工業株式会社 大阪工場内

【氏名又は名称】 内山 務

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002934]

1. 変更年月日	1992年 1月22日
[変更理由]	住所変更
住 所	大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
氏 名	武田薬品工業株式会社